

Aus der Augenklinik
des Klinikum Westend der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Josef Wollensak

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON
GLYKOSAMINOGLYKANEN AM CORNEAENDOTHEL

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Michael Hornung
aus Köln

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Augenklinik
des Klinikum Westend der
Freien Universität Berlin
Direktor: Prof.Dr.med. Josef Wollensak

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON
GLYKOSAMINOGLYKANEN AM CORNEAENDOTHEL



INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Michael Hornung
aus Köln

Referent: Prof.Dr.med,Josef Wollensak

Korreferent: Prof.Dr. H.-J. Merker



Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 10.1.1978

Herrn Prof. Dr. med. Josef WOLLENSAK möchte ich für die Überlassung des Themas und für die wissenschaftliche Beratung allerherzlichsten Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Fräulein Gundula SIEBER, die mir mit ihren Kenntnissen auf dem Gebiet der Elektronenmikroskopie und Chemie die Einarbeitung sehr erleichtert hat.

Für die freundliche Unterstützung bei der Herstellung der REM-Aufnahmen und die Durchführung der energiedispersiven Röntgenmikroanalysen möchte ich Frau Anne-Marie MULTIER und Herrn Dr. Dietmar HODER (Elektronenmikroskopisches Labor) danken.

Berlin, im Juli 1977

Zusammenfassung

Das Corneaendothel dreier Spezies (Mensch, Hund, Meerschweinchen) wird mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM), dem Rasterelektronenmikroskop (REM) und der energiedispersiven Röntgenmikroanalyse auf Glykosaminoglykane untersucht. Da die angewendete Ruthenium-Rot-Färbemethode (RR) allein keine eindeutigen Aussagen zuläßt, wird zusätzlich eine testikuläre Hyaluronidase zur enzymatischen Andauung der Glycocalyx verwendet. Nach der Inkubation in Hyaluronidase erscheint der RR-kontrastreiche Saum auf der äußeren Lamelle der Zellmembran im TEM und REM aufgelockerter. Bei der energiedispersiven Röntgenmikroanalyse wird die Ru-Zacke kleiner als die S-Zacke.

Diese eindeutigen Ergebnisse erhält man nicht, wenn die Präparate vor ihrer spezifischen Behandlung 24 Stunden in Glutaraldehyd fixiert werden.

Die Gesamtwürdigung der einzelnen Ergebnisse läßt den Schluß zu, daß RR auch ohne OsO_4 neben anderen sauren Gruppen in der Zellmembran diejenigen der möglicherweise vorhandenen Glykosaminoglykane markiert.

Bei den drei untersuchten Spezies fanden sich keine unterschiedlichen Ergebnisse.

Einige Aufnahmen zeigen, daß RR/ OsO_4 durch den Interzellularspalt in die Descemet'sche Membran vorzudringen vermag.

Summary

The cornea endothelium of three species (man, dog, guinea pig) was examined for glycosaminoglycans by TEM, REM and Energy-Dispersive-Analysis-of-X-rays (EDAX). As no clear statement can be made, when using Ruthenium-Red (RR) alone, a testicular hyaluronidase was used to digest the glycocalyx. After incubation with hyaluronidase the dark RR-borderline of the outer leaflet of the cell-membrane became more fluffy when examined in TEM and REM. The Ru-peak becomes smaller compared with the S-peak, when Energy-Dispersive-Analysis-of-X-rays is applied.

These impressive results have not been found when the material had been fixed in glutar-aldehyd for 24 hours before incubation.

Appreciating every single result, you can draw the conclusion that RR, even without OsO_4 , marks the acid groups of possible glycosaminoglycans of the cell-membrane besides other ones. There was no difference in the results of the three species used in this experiment.

Some pictures show RR/ OsO_4 penetrate through the intercellular space into Descemet's membrane.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. Einleitung

I.1.	Hornhauttrübungen	1
I.2.	Anatomie und Topochemie des Corneaendothels	2

II. Material und Methode

II.1.	Das Endothel	4
II.2.	Färbung mit Ruthenium-Rot	5
II.3.	Vorbehandlung mit Hyaluronidase	6
II.4.	Nachfixierung mit Osmiumsäure ohne Ruthenium-Rot	7
II.5.	Kontrolle zur Enzymbehandlung	7
II.6.	Fixierung der Cornea vor der Färbung mit Ruthenium-Rot und vor Inkubation in Hyaluronidase	8
II.7.	Vorbereitung der Cornea für das Transmissionselektronenmikroskop	8
II.8.	Rasterelektronenmikroskop	9
II.9.	Energiedispersive Röntgenmikroanalyse	9

III. Ergebnisse

III.1.	Nur mit Ruthenium-Rot gefärbte Präparate	10
III.2.	Mit Hyaluronidase vorbehandelte Präparate	11
III.3.	Kontrollversuche	12

IV. Diskussion 15

V. Bildanhang 21

VI. Literaturverzeichnis 42

I. Einleitung

I.1. Hornhauttrübungen

Eine Trübung der Hornhaut kann durch verschiedene Ursachen hervorgerufen werden: Neben den seltenen Speicherkrankheiten, z.B. den Mukopolysaccharidosen, entstehen Trübungen häufiger nach Verletzungen und Verätzungen, im Rahmen einer Entzündung oder als Begleiterscheinung des Glaukoms.

Die Transparenz der Cornea ist nach MAURICE (1960, 1968) und REIM (1972) abhängig von der Anordnung der Kollagenfibrillen im Stroma, von der Konzentration und der Zusammensetzung der Glykosaminoglykane, deren Wassergehalt und von der Energieproduktion der einzelnen Zellen. Die Absättigung der negativen Valenzen der Glykosaminoglykane mit Natriumionen hat einen wesentlichen Einfluß auf das Quellungsvermögen der Cornea. Dabei spielen energieabhängige Stoffwechselfumpen im Endothel und Epithel wahrscheinlich eine bedeutende Rolle (FISCHBARG et al 1974, KLYCE 1975, HODSON et al 1976, REIM 1972, MAURICE 1968, 1969, DONN et al 1959).

In diesem Zusammenhang ist die Feststellung von FRANÇOIS und WEITZMAN (in HARNISCH 1976) interessant, daß das Cortisonglaukom durch Cortison-induzierte Veränderungen im Hydrationszustand der Mukopolysaccharide des Trabekelwerkes zustande kommt.

Aus der gesamten Literatur der letzten 15 Jahre geht hervor, daß das Endothel die entscheidenden Funktionen ausübt, die für den Wassertransport aus dem Stroma und damit für die Transparenz der Cornea die Voraussetzung bilden.

I.2. Anatomie und Topochemie des Corneaendothels

Das einschichtige, flache Corneaendothel trennt das Corneaparenchym vom Kammerwasser. Die elektronenmikroskopische Definition der Interzellularkontakte des Corneaendothels bereitet immer noch Schwierigkeiten, da mehrere Autoren zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen und verschiedene Terminologien benutzt werden.

KAYE et al (1962), MISHIMA et al (1967) und WULLE et al (1974) bezeichneten die Zellverbindungen, die ein sog. Schlußleistennetz bilden, als „Zonulae occludentes“ und folgerten, daß der Hauptweg des Kammerwassers durch die zellulären Membranen des Corneaendothels führt.

Andere Autoren dagegen fanden, daß die Zellverbindungen doch nicht so fest sein können, da zwischen ihnen ein osmiophiler Mittelstreifen frei bleibt, der möglicherweise eine Kittsubstanz darstellt. Statt des Begriffes „Zonula occludens“ wurde „Macula adhaerens“ gewählt (STAEHELINS 1974, SHABO et al 1973, Symposium on the Cornea 1972, BENNINGHOFF et al 1968).

OTTERSEN et al (1977) beschreiben eine Zone punktförmiger Zellverbindungen im apikalen Teil des Interzellularspaltes des Endothels. Die Autoren bezeichnen diese Zellkontakte auch als „tight junctions“, da die äußeren Lamellen der Zellmembranen miteinander verschmolzen sind. In der Tiefe des Interzellularspaltes finden sich dagegen „gap junctions“, auch „Nexus“ genannt, bei denen die Zellmembranen durch einen 20-Å-breiten Spalt getrennt werden.

BLÜMCKE et al (1966, 1977) konnten nachweisen, daß es sich bei den oberen Membranverbindungen um punktförmige desmosomale Interzellularkontakte handelt, die kein „Schlußleistennetz“ bilden, während die unteren echte Membranverschmelzungen („Attachment zones, type I“) darstellen.

Eine Beschreibung des Endothels als Schutzbarriere zwischen Kammerwasser und Stroma bliebe aber unvollständig, ginge sie nicht auf die Strukturen ein, die zur Zellmembran gehören.

Frühe Experimente über den Einfluß testikulärer Hyaluronidase auf den Ausflußwiderstand im vorderen Kammerwinkel ließen darauf schließen, daß im Interzellularspalt Mukopolysaccharide liegen (BARANY 1956, BERGGREN et al 1957, MELTON et al 1959). Mehrere Untersucher kamen - vor allem in den sechziger Jahren - zu der Auffassung, daß fast alle von ihnen untersuchten Zellen, auch tierische, von einem dünnen Oberflächenmantel bedeckt werden, der nicht Teil der Plasmamembran selbst ist (BENNETT 1963, RAMBOURG et al 1967, COOK 1968, SZUBINSKA et al 1971, LUFT 1971).

Das Konzept der Elementarmembran von DANIELLI und DAVSON (1935) kann daher heutigen Untersuchungen über den Aufbau und die Funktion der Zellwand nicht mehr genügen.

VRABEC fand 1957 mit der Replica-Technik auf der Oberfläche des Endothels Falten, „die auf die Existenz einer oberflächlichen Schicht irgendeiner Zusammensetzung“ hinwiesen. Diese amorphen Substanzen ließen sich mit testikulärer Hyaluronidase andauen, so daß die darunterliegenden Details deutlicher wurden. VRABEC schreibt, daß schon VIRCHOW diese „geleeartige Substanz“ vermutet hat und der morphologische Nachweis mit den klassischen histologischen Methoden schwer zu führen ist, hauptsächlich wegen des hohen Wassergehaltes dieser Substanz.

BENNETT (1963) hat dann den an Polysacchariden reichen extrazellulären Mantel bei Pflanzen- und Tierzellen unter dem Begriff „Glycocalyx“ (grch.= süße Hülle) zusammengefaßt (frühere Namen: Schleimhülle, Zona pellucida, Kutinschicht, Erythrocytenantigene).

Bei Fischen und einigen Vögeln, besonders bei Eulen, ist ein dicker muzinöser Mantel auf dem Corneaendothel bekannt (Symposium on the Cornea, 1972).

SCHWARZ (1973) hat mit der Ruthenium-Rot-Färbemethode (RR) einen solchen Glykosaminoglykanfilm am Corneaepithel des Haushuhns nachgewiesen, HARNISCH (1976) am Endothel des Trabekelwerkes von Glaukompatienten.

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der RR-Färbung und elektronenmikroskopischer Untersuchungsmethoden einen Glykosaminoglykanfilm am Corneaendothel verschiedener Spezies nachzuweisen.

II. Material und Methode

II.1. Das Endothel

Bei der Auswahl des Corneaendothels wurde eine Beobachtung von MELTON et al (1960) berücksichtigt, daß nämlich Hyaluronidase bei Perfusionsversuchen am Meerschweinchen und Kaninchen einen deutlichen Anstieg, bei Hund und Katze jedoch keine statistisch signifikante Veränderung der Ausflußleistung bewirkte. Um die oben erwähnten Befunde eines Glykosaminoglykanfilms allgemeingültig an allen Endothelzellen zu bestätigen, wurde bei dieser Arbeit das Corneaendothel von drei Spezies untersucht, nämlich vom Meerschweinchen, vom Hund und vom Menschen.

Alle Tiere bekamen im Zeitraum vor den Versuchen keine Medikamente verabreicht, da der Einfluß von Medikamenten auf die Ultrastruktur der Cornea zusätzlich hätte berücksichtigt werden müssen (BABEL 1972).

Die Meerschweinchen (n=13, 1/4 J.) wurden mit Natrium-Pentobarbital (Nembutal), der Hund (Beagle, 3 1/2 J.) mit Thiopental (Trapanal) eingeschläfert.

Sofort nach dem Erlöschen des Cornealreflexes wurde den Tieren der zentrale, z.T. auch der periphere Teil der Cornea mit dem Trepan und der Rasierklinge herausgeschnitten und weiter unterteilt. Dies erfolgte innerhalb weniger Minuten, um die schon sehr früh einsetzenden autolytischen Prozesse am Endothel (SHABO et al 1973, BERGGREN et al 1957, SZUBINSKA et al 1971) soweit wie möglich zu reduzieren.

Das Corneaendothel vom Menschen stammt aus den enukleierten Augen (n=4) einer 68 Jahre alten Patientin mit absolutem

Glaukom, einer 74 Jahre alten Patientin mit Amaurose bei intakter Cornea, einem 72 Jahre alten Patienten mit Aderhaut-melanom und einer 3 Jahre alten Patientin mit Retinoblastom.

II.2. Färbung mit Ruthenium-Rot (RR)

Die Anfärbung des Materials erfolgte in abgewandelter Form auf der Basis der Arbeiten von LUFT (1971) und SCHWARZ (1973).

Da keine Abhängigkeit des Schwärzungsgrades von der Konzentration der Ruthenium-Rot-Lösung (LUFT 1971 b), wohl aber eine Abhängigkeit gegenüber diesem Farbstoff bei Verlängerung der Exposition der Mukopolysaccharide bekannt ist (SZUBINSKA et al 1971), wurden die einzelnen Corneateile 20 Minuten in einem Gemisch aus 1,4% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,4 und 1500 ppm RR ($\text{Ru}_2(\text{OH})_2\text{Cl}_4 \cdot 7 \text{ NH}_3 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$, Fa. Merck, Darmstadt) fixiert. Anschließend wurden die Präparate über Nacht in cacodylatgepuffertem Glutaraldehyd nachfixiert. Danach erfolgte ein Waschen in 0,1 M Cacodylatpuffer mit 800 ppm Ruthenium-Rot für zwei Stunden. Die Präparate für das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wurden dann in 2% Osmiumsäure (OsO_4) in Cacodylatpuffer und 400 ppm RR nochmals für 1,5 Stunden fixiert und kontrastiert. Auf ein zweites Waschen in physiologischer Kochsalzlösung ohne RR (2 x 15 Min.) folgte die Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe (70, 80, 90, 96,8% Äthanol, jeweils 2x15 Min.), dann über Nacht in 96,8% Äthanol und zuletzt in Propylenoxid (45 Min. und 1,5 Stunden). Über Nacht wurden die Präparate in ein Gemisch aus Epon und Propylenoxid (1:2), über drei Tage in das gleiche Gemisch mit geänderten Konzentrationen gelegt (1:2, 1:1, 2:1).

Als Einbettungsmittel wurde das aliphatische Epoxydharz (Epon 812, Fa. Serva, Heidelberg) wegen seiner Dünnschmelzbarkeit und damit guten Durchdringungsfähigkeit gewählt.

Nach der Einbettung in Epongemisch wurden die Blöcke über 12 Stunden bei 41°C, danach über 48 Stunden bei 60°C aus-

polymerisiert.

Einige Präparate für das Rasterelektronenmikroskop und die energiedispersive Röntgenmikroanalyse wurden nicht mit Osmium nachfixiert, sondern gleich der Entwässerungsreihe unterworfen und danach aus dem 96,8% Äthanol in Aceton gebracht. Mit der Critical-Point-Methode wurden die Präparate für das REM getrocknet (MULTIER 1974).

Eine andere Präparatengruppe wurde vor der RR-Behandlung und vor der enzymatischen Behandlung erst 24 Stunden in einem Gemisch aus 1,4% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) fixiert (HÜNDGEN et al 1971, GRIERSON et al 1975).

II.3. Vorbehandlung mit Hyaluronidase

Bei allen Versuchen wurden Corneapräparate in einer testikulären Hyaluronidase (nach internationaler Nomenklatur Hyaluronatlyase Number 4.2.2.1., FLORKIN-STOTZ 1973) inkubiert. Hier wurde Kinetin^R (Fa. Schering, Berlin) benutzt, ein Enzym, das BARANY (1954) bei seinen Perfusionsversuchen und BUDDECKE et al (1966) an der Cornea benutzt haben. BUDDECKE et al fanden, daß sämtliche Chondroitinfraktionen der menschlichen Cornea 42,3 % der gesamten Mukopolysaccharide der Cornea ausmachen. Der Rest ist Keratansulfat (43,5%) und Chondroitin-6-sulfat (14,0%).

Kinetin^R ist das Präparat mit den geringsten Verunreinigungen durch weitere Glycosaminoglycano-Hydrolasen (PLATT 1970). Die Enzymaktivität dieses Präparates für Hyaluronsäure liegt bei 0,20 E₅₄₆/mg Protein/min, für Chondroitin 0,08 E₅₄₆/mg Protein/min, für Chondroitin-6-sulfat bei 0,05 E₅₄₆/mg Protein/min. Im Vergleich mit den anderen untersuchten Enzympräparaten ist die Aktivität für Chondroitin und Chondroitin-6-sulfat bei diesem Enzym am größten. Neben den Enzymen, die am Abbau der Mukopolysaccharidkomponente beteiligt sind, konnte im Kinetin^R auch die Aktivität von

Kathepsin nachgewiesen werden. Kathepsin greift in den Abbau der Proteinkomponente der Mukopolysaccharide ein (PLATT 1970).

Die zunächst unfixierten Präparate wurden bei Raumtemperatur 20 Min. in Kinetin^R (300-1500 I.E.) inkubiert, das mit Tris-HCL-Puffer (pH 7,2) gelöst war. Die in Anlehnung an GRIERSON et al (1975) vorher fixierten Präparate wurden 24 Stunden bei Raumtemperatur in Kinetin^R (1500 I.E.) inkubiert.

Danach folgte die Weiterverarbeitung, wie unter II.2. angegeben (Färbung mit RR).

II.4. Nachfixierung mit Osmiumsäure ohne Ruthenium-Rot

Die Präparate wurden entsprechend Abschnitt II.2. behandelt, jedoch wurde RR weggelassen. Die Fixierung erfolgte also mit 1,4% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer, die Nachfixierung und Kontrastierung in cacodylatgepufferter 2% Osmiumsäure.

Somit wurde ein Kontrollversuch aufgebaut, der eine ausschließliche Anfärbung der Glykosaminoglykane durch Osmiumsäure verhindern sollte. Da bei dieser Serie keine Glykosaminoglykane angefärbt werden sollten, konnten die Präparate gleichzeitig als Bezugspunkte zur Auswertung der Wirkung der Hyaluronidase auf den evtl. vorhandenen Glykosaminoglykanfilm herangezogen werden.

II.5. Kontrolle zur Enzymbehandlung

Hier wurden die Präparate wie in Abschnitt II.3. (Vorbehandlung der Cornea mit Hyaluronidase) behandelt, jedoch wurde nur das Lösungsmittel Tris-HCL-Puffer ohne das Enzym verwendet. Damit sollten unspezifische Wirkungen des Tris-HCL-Puffers, z.B. im Sinne eines Auswaschungseffektes (BARANY 1954 b), ausgeschlossen werden.

II.6. Fixierung der Cornea vor der Färbung mit Ruthenium- Rot und Inkubation in Hyaluronidase

Da GRIERSON et al (1975) bei ihren Untersuchungen am Kammerwinkel vor der Behandlung des Materials mit kolloidalem Thorium und Eisen bzw. vor der Behandlung mit testikulärer Hyaluronidase die Präparate 24 Stunden mit 3% Glutaraldehyd in 0,2 M Natrium-Cacodylatpuffer (pH 7,2-7,4) bei 4°C fixierten, wurden einige der Corneae ebenfalls vorher fixiert, hier jedoch mit 1,4% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer.

Dabei sollte untersucht werden, ob die vorangegangene lange Fixierung andere Ergebnisse bringt als die zunächst unfixiert verarbeiteten Corneae.

II.7. Vorbereitung der Cornea für das Transmissionselektronenmikroskop

Aus Semidünnschnitten, die mit May-Grünwaldscher Lösung angefärbt waren, wurden unter dem Lichtmikroskop zusammenhängende Endothelbezirke für das Elektronenmikroskop herausgesucht. Mit dem LKB Ultratome 4800 wurden Ultradünnschnitte hergestellt, deren Dicke mit der Interferenzmethode nach BACHMANN/SITTE und PEACHEY (REIMER 1967) auf 500-800 Å geschätzt wurde.

Die Ultradünnschnitte wurden dann auf Kupfernetze gelegt, die mit einer aus Formvarlösung hergestellten Folie bedeckt waren, und mit Uranylacetat und Bleicitrat in Anlehnung an REYNOLDS (1963) kontrastiert. (Lösungen: Uranylacetat (Fa. Merck, Darmstadt): 5% in 50% Äthanol, Kontrastierungszeit 40 Min.- Bleicitrat: 1,33 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ und 1,76 g $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7) \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in ca. 30 ml H_2O dest. und 8 ml 1 n NaOH (ggf. mehr, bis die Lösung klar ist), dann auf 50 ml mit H_2O auffüllen (pH=12). Kontrastierungszeit 15 Min. Spülen mit 0,1 n NaOH und H_2O .)

Die Fotos wurden mit dem AEI Elektronenmikroskop Corinth 275 aufgenommen.

II.8. Rasterelektronenmikroskop (REM)

Um Zufallsergebnisse bei der Beurteilung von Endothelquerschnitten im Transmissionselektronenmikroskop zu vermeiden und um einen Überblick über das Verteilungsmuster der RR-Auflagerungen auf der Endotheloberfläche zu erhalten, wurden Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop hergestellt (REM Stereoscan MK II, Cambridge). Nach Durchführung der energiedispersiven Röntgenmikroanalyse wurden die Präparate für das REM mit Gold bedampft.

II.9. Energiedispersive Röntgenmikroanalyse (EDAX)

In Verbindung mit dem Rasterelektronenmikroskop wurde gleichzeitig eine Analyse der verschiedenen im Endothel vorkommenden Elemente angeschlossen, denn für die schnelle qualitative Analyse von Oberflächen ist die energiedispersive Analyse das ideale Verfahren. EDAX basiert auf dem MOSELEYschen Gesetz, nach dem eine lineare Abhängigkeit zwischen der Frequenz ν der Röntgen-K(α)-Linie vom Quadrat der Ordnungszahl Z der Elemente besteht (HANTSCHKE 1974).

Diese Methode wurde benutzt, um in den grobkörnigen Auflagerungen, die mit dem REM gefunden wurden, das Element Ru zu verifizieren.

Zur Analyse wurde die Anlage der Fa.Ortec in Verbindung mit dem oben genannten REM benutzt.

Energie der Röntgenquanten in KeV: Na-1,06, Al-1,48, Si-1,74, P-2,01, S-2,30, Ru-2,55, Cl-2,62, K-3,3, Ca-3,6.

III. Ergebnisse

III.1. Nur mit Ruthenium-Rot gefärbte Präparate

Die Resultate nach den verschiedenen Behandlungsmethoden zeigten bei den einzelnen Spezies keine Unterschiede, so daß sie bei den folgenden Ergebnissen nicht mehr differenziert zu werden brauchen.

Das mit RR markierte Material zeigt als auffallendstes Charakteristikum im Transmissionselektronenmikroskop einen nach außen und innen scharf abgrenzbaren, nicht immer gleichmäßig breiten, dunklen Saum (Abb.3, 4, 8, 9, 12, 15, 20, 24). In dem relativ homogenen Band fallen vereinzelt grobkörnige Strukturen auf (Abb.4, 15). Die kontrastreichen Niederschläge lassen sich teilweise auch im Interzellularspalt nachweisen, z.T. sogar zwischen dem basalen Teil der Endothelzelle und der Descemetischen Membran und in dieser selbst (Abb.28). Auch in den Mikropinozytosevesikeln findet man elektronendichte Einlagerungen.

Im Rasterelektronenmikroskop sieht man sowohl bei den zunächst nicht fixierten als auch bei den 24 Stunden lang fixierten, RR-gefärbten Präparaten plane Endothelzellen mit grobkörnigen Auflagerungen (Abb.30, 33, 36, 40). Die Oberflächenstruktur der Zellen ist nur schwer zu erkennen. Es scheint, als ob ein dicker Mantel die Zelloberfläche zudeckt (Abb.40). Dieser Eindruck entsteht besonders, wenn nicht nur RR, sondern RR/OsO₄ als Färbemethode angewandt wurde (Abb.44). Besonders im Bereich der Interzellularspalten finden sich größere, bizarre Auflagerungen, während auf der Zelloberfläche nur kleinere Gebilde liegen (Abb.33, 34, 40).

Bei der energiedispersiven Röntgenmikroanalyse ganzer Zelloberflächen, die vor ihrer spezifischen Behandlung nicht fixiert worden sind, finden sich verschieden hohe Zacken für die Elemente Phosphor (P), Schwefel (S) und Ruthenium (Ru). Dabei ist die Ru-Zacke immer höher als die S-Zacke (Abb.47, 54).

Wurden die Corneae erst 24 Stunden in Glutaraldehyd fixiert,

so zeigt sich bei Zellen, die mit RR/OsO_4 markiert wurden, eine wesentlich höhere Ru-Zacke als bei solchen, die nur mit RR gefärbt wurden (vergl. Abb.60 und 59).

Die im REM auf dem Endothel nach RR-Färbung weiß imponierenden, z.T. bizarren Gebilde (Abb.30, 42, TEM: Abb.14, 17, 22) werden als Verbindungen analysiert, die besonders hohe Ru-Zacken ergeben. (Auch nach Hyaluronidasebehandlung finden sich solche Klumpen, die RR enthalten, auf der Zelloberfläche (Abb.14, 17, 22, 26)).

III.2. Mit Hyaluronidase vorbehandelte Präparate

Die Präparate, die ohne primäre Fixierung 30 Minuten in Hyaluronidase inkubiert wurden, weisen als auffälligstes Merkmal eine Schwellung aller Zellbestandteile auf. Die Aufnahmen des TEM zeigen ein aufgelockertes, verbreitert erscheinendes Zytoplasma, in dem man vereinzelt gequollene Mitochondrien, gewölbte apikale Zellgrenzen und vakuoläre Strukturen im Interzellularspalt erkennt (Abb.5). Auf den Zellmembranen findet sich ein kontrastgebender Saum (Abb.5, 6, 11, 14, 17, 26), der aber aufgelockerter und weniger kompakt erscheint als die sofort mit RR/OsO_4 markierten Corneae. Oft finden sich grobkörnige Gebilde innerhalb des homogenen Saumes (Abb.14, 26).

Die Präparate, die vor der Hyaluronidasebehandlung primär 24 Stunden vorfixiert und dann 24 Stunden in mehrmals erneuerter Hyaluronidase inkubiert wurden, zeigen keine Quellung. Die Strukturen der intrazellulären Elemente (Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum) sind gut zu erkennen (Abb.22). Der auf der Zellmembran aufliegende kontrastreiche Saum (Abb.22, 26) ist gegenüber dem auf der Cornea ohne Enzymbehandlung (Abb.20, 24) etwas verbreitert, aufgelockerter und unschärfer begrenzt.

Abb.18 zeigt eine mit Hyaluronidase behandelte Zelle, deren Zellgrenzen zerstört sind und deren Zytoplasma eben-

falls kontrastreiche Einlagerungen enthält.

Auch nach Hyaluronidasebehandlung findet sich in der Tiefe des Interzellularspaltes RR/OsO_4 -positives Material, das in die Descemetische Membran zu penetrieren scheint (Abb.27). Der Saum auf der äußeren Zellmembran ist deutlich aufgelockert.

Die Bilder aus dem Rasterelektronenmikroskop (32, 35, 38, 42, 46) zeigen plane, z.T. aber auch blasig aufgetriebene Endothelzellen. Bei den unfixiert enzymatisch behandelten Zellen (Abb.32, 35, 38) erkennt man eine deutliche Reduktion der Ru-enhaltenden Auflagerungen im Vergleich mit den Präparaten, die sofort mit RR inkubiert wurden. Die Interzellularspalten imponieren als tiefe Schluchten zwischen den einzelnen Zellen (Abb.35). Bei den zunächst fixierten Präparaten sind die Wirkungen des Enzyms immer geringfügiger als bei den unfixierten Zellen. Dabei besteht kein Unterschied, ob die Zellen mit RR oder mit RR/OsO_4 markiert wurden (Abb.42, 46).

Die energiedispersive Röntgenmikroanalyse zeigt nach Inkubation der Cornea in Hyaluronidase Veränderungen in der Höhe der Ru-Zacke (Abb.49, 52, 56, 63, 64). Nach Hyaluronidasebehandlung ist bei den unfixiert enzymatisch behandelten Präparaten die Ru-Zacke deutlich niedriger als die S-Zacke (Abb.49, 56). Werden die Corneae vor der Inkubation mit Hyaluronidase jedoch fixiert (Abb.52, 63), so ist keine so klare Reduzierung in der Höhe der Ru-Zacke gegenüber der S-Zacke vorhanden.

III.3. Kontrollversuche

Die weder mit RR noch mit Hyaluronidase behandelten, nur mit OsO_4 fixierten Corneae lassen bei allen Spezies ein gut erhaltenes flaches Endothel ohne irgendwelche Auflagerungen erkennen (Abb.1, 2, 7, 19, 23).

Auf den REM-Aufnahmen finden sich besonders deutliche Oberflächen, deren Struktur bis auf einige warzenähnliche Gebilde keine Auffälligkeiten zeigt (Abb.29, 39). Manchmal wölbt

der Zellkern die Zellmembran vor (Abb.39). Die Osmierung führt - ohne RR - schon zu körnigen Auflagerungen (Abb.43), die aber kleiner als die der RR/OsO_4 -Verbindungen sind und eine weniger gleichmäßige Verteilung aufweisen.

Entsprechend der RR-freien Behandlung finden sich bei der energiedispersiven Röntgenmikroanalyse dieser Corneae eine gegenüber der S-Zacke niedrige Cl-Zacke, aber keine Ru-Zacke (Abb.53, 57). Die Osmierung einiger Präparate brachte außer dem Auftreten der Osmiumzacke keine Veränderung im Kurvenverlauf (Abb.58).

Zellen, die mit dem Lösungsmittel des Enzyms, Tris-HCl-Puffer, inkubiert und dann der üblichen RR/OsO_4 -Behandlung unterworfen wurden, zeigen einander entsprechende Ergebnisse, gleichgültig ob sie vorher 24 Stunden in cacodylatgepuffertem Glutaraldehyd gelegen hatten oder unfixiert waren (Abb.10, 13, 16, 21, 25). Der kontrastreiche Saum auf der Zellmembran ähnelt dem der Endothelzellen, die keine Tris-HCl-Puffer-Inkubation durchzumachen hatten, sondern gleich mit RR/OsO_4 markiert wurden. Präparate, die vor ihrer Tris-HCl-Puffer-Behandlung fixiert worden waren, zeigen in den TEM-Aufnahmen aber einen etwas schmalen RR-Saum (Abb.21, 25). Die zytoplasmatischen Strukturen erfuhren durch diese Behandlung nicht die Veränderungen, die während der enzymatischen Andauung unfixierter Corneae auftraten; die Zellen sind nicht gequollen und zeigen kaum Vakuolen.

Die REM-Aufnahmen Tris-HCl-inkubierter Zellen gleichen etwa den Präparaten, die sofort mit RR gefärbt wurden (Abb.31, 34, 37, 41, 45). Bei den unfixierten Zellen fanden sich aber erheblich weniger grobkörnige Auflagerungen auf der Oberfläche (Abb.31).

Das Verhältnis der Ru-Zacke zur S-Zacke bei der energiedispersiven Röntgenmikroanalyse Tris-HCl-Puffer-behandelter Corneae entspricht etwa dem der Präparate, die sofort einer RR-Markierung unterworfen wurden (Vergl. Abb. 48, 51, 55, 61, 62 mit Abb. 47, 50, 54, 59, 60). Dabei besteht kein

Unterschied zwischen Corneae, die unfixiert und solchen, die fixiert der Tris-HCl-Puffer-Behandlung unterworfen wurden (Abb. 48, 51).

Osmierte Präparate zeigen nach der Tris-HCl-Puffer-Behandlung eine gegenüber der S-Zacke höhere Ru-Zacke als die nicht osmierten Zellen (Vergl. Abb. 62 und 61), entsprechend der höheren Ru-Zacke bei Endothelzellen, die gleich nach der Fixierung mit RR/OsO₄ markiert wurden, gegenüber solchen Corneae, die nur mit RR gefärbt waren (Vergl. Abb. 60 und 59).

IV. Diskussion

Die Ruthenium-Rot-Färbung wird seit Jahrzehnten von verschiedenen Autoren benutzt, um einen Glykosaminoglykanfilm an Zellmembranen nachzuweisen (LUFT 1964, 1971, GUSTAFSON et al 1967, SZUBINSKA et al 1971, SCHWARZ 1973, MERKER et al 1971, 1973 und MYERS et al 1969). Daß diese Methode jedoch nicht spezifisch ist, haben mehrere Autoren betont (LUFT 1971 b, MERKER 1971, BLECKMANN 1976). Ganz besonders BLANQUET (1976) hat sich um die Spezifität der RR-Färbemethode bemüht. Er fand heraus, daß durch das RR/OsO_4 -Gemisch alle sauren Gruppen in der äußeren Lamelle der Zellmembran markiert werden: die Carboxylgruppen der Sialoglykolipide, der Sialoglykoproteine und der Aminosäuren, die Sulfatgruppen der Glykolipide und Glykosaminoglykane und die Phosphatgruppen der Phospholipide.

Bei den Untersuchungen dieser Arbeit fanden sich u.a. Zellen, deren intrazelluläre Elemente ebenfalls durch RR/OsO_4 angefärbt waren (Abb.18). Dies beruht sicherlich auf einer zerstörten Zellmembran, die es dem RR nach postmortalen Veränderungen ermöglicht, die intrazellulären sauren Gruppen zu markieren (LUFT 1971 a, b, GEBBERS 1974, BLANQUET 1976).

Die RR-Färbemethode allein kann deshalb nicht zum Nachweis von Glykosaminoglykanen herangezogen werden, da sie keine genügende Spezifität besitzt.

Aus diesem Grunde wurde in den Versuchsaufbau eine Hyaluronidase eingefügt (Kinetin^R der Fa. Schering, Berlin). Dieses Präparat gilt zwar als das reinste Enzympräparat, das sich z.Zt. im Handel befindet, hat aber dennoch zusätzliche andere Enzymaktivitäten. Bei pH 7,2 dürfte u.a. eine geringe Kathepsinaktivität wirksam sein (PLATT 1970, 1977). Aus den vorliegenden Arbeiten darf aber geschlossen werden, daß Kinetin im Vergleich mit anderen Enzympräparaten die höchsten Aktivitäten für Hyaluronsäure, Chondroitin und Chondroitin-6-sulfat hat.

Daß es sich bei dem kontrastreichen Saum an der äußeren

Lamelle der Endothelzellmembran u.a. mit großer Wahrscheinlichkeit um Glykosaminoglykane handelt, die mit RR markiert sind, darf aus den Zusatzversuchen geschlossen werden. Zwar zeigen einige Aufnahmen (Abb.10, 16), daß ein geringer Auswaschungseffekt im Sinne von BARANY (1954 b) vorhanden ist. Nach Hyaluronidasebehandlung finden sich aber viel stärkere und andersartige Veränderungen in der Struktur des RR-positiven Saumes. Dieser erscheint jetzt flauschig aufgelockert und weniger kompakt als die Präparate, die sofort mit RR oder mit Tris-HCl-Puffer und dann mit RR inkubiert wurden.

Auch die Ergebnisse der energiedispersiven Röntgenmikroanalyse (EDAX) lassen sich in Richtung auf eine Anfärbung von Glykosaminoglykanen deuten:

Da wegen der unterschiedlichen Dicke des Untergrundes bei den einzelnen Präparaten und wegen der verschiedenen Abstrahlungswinkel für den Elektronenstrahl bzw. die Röntgenstrahlung eine quantitative Bestimmung nur mit Einschränkung möglich ist, wurde in dieser Untersuchung die S-Zacke als Referenzwert festgelegt. Sie repräsentiert u.a. die wahrscheinlich im Corneaendothel enthaltenen Glykosaminoglykane. Die Höhe der S-Zacke zeigt im Vergleich mit der Höhe des Untergrundes die geringsten relativen Schwankungen nach den verschiedenen Behandlungen. Außerdem kann wohl davon ausgegangen werden, daß eine Veränderung in der Höhe der S-Zacke durch Ablösung sulfatierter Glykosaminoglykane über den Auswaschungseffekt immer mit einer entsprechenden Veränderung in der Höhe der Ru-Zacke einhergeht, so daß das Verhältnis der beiden Zacken immer gleich bleibt. Entsprechend der starken Wirkung des benutzten Enzyms auf die nicht sulfatierten Glykosaminoglykane (PLATT 1970, FLORKIN et al 1973) findet sich nach der Enzymbehandlung der zunächst noch unfixierten Präparate (Abb.49, 56) eine Herabsetzung in der Höhe der Ruthenium-(Ru)-Zacke gegenüber der Schwefel-(S)-Zacke im Vergleich mit den Corneae, die sofort mit RR gefärbt wurden (Abb.47, 54). Da RR auch

andere saure Gruppen markiert (BLANQUET 1976), ist nicht zu erwarten, daß die Ru-Zacke durch die Hyaluronidasebehandlung vollständig oder fast vollständig reduziert wird.

Daß diese Veränderung in der Höhe der Ru-Zacke eine Wirkung des Enzyms und kein Auswaschungseffekt ist, wird durch die Analysen der mit Tris-HCl-Puffer behandelten Präparate deutlich (Abb.48, 55). Die Ru-Zacke ist hier fast immer so hoch wie bei den Präparaten, die sofort mit RR behandelt wurden (Abb. 47, 54).

Anders, z.T. paradox sind die Verhältnisse bei den Zellen, die vor ihrer spezifischen Behandlung einer Fixierung unterworfen wurden (24 Stunden in cacodylatgepuffertem Glutaraldehyd). Dort veränderte sich die Ru-Zacke im Verhältnis zur Höhe der S-Zacke nur unwesentlich (Abb. 50-52, 59-64). Auch nach Hyaluronidasebehandlung zeigte sich keine wesentliche Veränderung in der Höhe der Ru-Zacke, verglichen mit den Präparaten, die sofort nach der Fixierung mit RR bzw. RR/OsO₄ gefärbt wurden. Das entspricht auch den Ergebnissen der transmissionselektronenmikroskopischen Bilder, bei denen der RR/OsO₄-Saum breiter, aber lockerer und weniger dicht erscheint (Abb.14, 22, 26) als bei den Präparaten, die nach der Fixierung sofort mit RR/OsO₄ markiert wurden (Abb.12, 20, 24). Die Erklärung für dieses Phänomen der gleich hohen Ru-Zacken mit und ohne Hyaluronidasebehandlung dürfte bei der 24stündigen Vorfixierung dieser Zellen in Glutaraldehyd zu suchen sein. Diese Fixierung reduziert wahrscheinlich die Eindringtiefe des RR in die Glycocalyx, während eine Hyaluronidasebehandlung nach Fixierung diese Struktur wieder auflockert, so daß dem RR mehr saure Gruppen zur Verfügung stehen, wodurch die Ru-Zacke in ihrer Höhe wieder zunimmt.

Corneae, die nach ihrer spezifischen Behandlung oder sofort mit RR und Osmium (RR/OsO₄) gefärbt wurden (Abb.60, 62, 64), zeigen deutlich höhere Ru-Zacken in der energiedispersiven Röntgenmikroanalyse im Verhältnis zur S-Zacke als diejenigen Präparate, die mit RR allein gefärbt wurden (Abb.59, 61,

63). Das entspricht auch den Ergebnissen der Arbeit von BLANQUET (1976). Danach entsteht innerhalb der Glycocalyx eine $RR-OsO_4$ -Komplexverbindung, die zu einer eindeutigen Markierung saurer Gruppen führt.

Aufgrund der Wirkung der Hyaluronidase an der äußeren Lamelle der Zellmembran, die mit RR (ohne Osmium !) gefärbt wurde (Abb.49, 56), kann auch auf die alleinige Affinität des RR zu Glykosaminoglykanen geschlossen werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit am Endothel vorhanden sind.

Zur Eindringtiefe von RR in verschiedene Gewebe haben sich u.a. LUFT (1971 a,b) und GEBBERS et al (1974) geäußert. In dieser Arbeit lagerte sich RR nicht nur an der äußeren Lamelle der Zellmembran an, sondern drang auch durch den Interzellularspalt bis an die basale Grenzschicht der Endothelzelle vor und lagerte sich dort zwischen der Zelle und der Descemetischen Membran und in dieser selbst an. Diese Fähigkeit des RR/OsO_4 -Komplexes, durch den Interzellularspalt in die Descemetische Membran zu penetrieren, spricht dafür, daß trotz der verschiedenen Interzellularkontakte für RR eine direkte interzelluläre Verbindung zwischen Vorderkammer und Descemetischer Membran besteht. Es darf außerdem mit BLÜMCKE et al (1976, 1977) angenommen werden, daß es im Gegensatz zu WULLE et al (1974) im apikalen Teil des Corneaendothels kein „Schlußleistennetz“ gibt.

Aus den Versuchen von KAYE et al (1962) geht hervor, daß größere kolloidale Partikeln von Mikropinozytosevesikeln auf der Kammerwasserseite vom Endothel aufgenommen und dann in den Interzellularspalt abgegeben werden. Diese Befunde dürften für das RR-positive Material jedoch nicht zutreffen, da die Endothelzellen gleichzeitig mit der RR-Färbung in Glutaraldehyd fixiert worden sind. Dabei wird vorausgesetzt, daß Glutaraldehyd sehr schnell zu einer Unterbrechung der aktiven Stoffwechselprozesse führt, die für die Mikropinozytose notwendig sind. Außerdem fand sich in den TEM-Bildern keine Häufung RR-gefüllter Pinozytosevesikel.

Nicht alle Teile der Membranen und Interzellularräume sind jedoch gleichmäßig mit RR anfärbbar. Dies könnte nach GEBBERS et al (1974) darauf beruhen, daß eine unterschiedliche Affinität für RR besteht, deren Ursache (1) der funktionelle Zustand, (2) der Polymerisationsgrad, (3) die elektrische Ladung, (4) die Zusammensetzung und (5) das Alter der Membranen sein können. Auch die drei verschiedenen Erscheinungsformen des Ruthenium-Rots auf der Membran (homogen, grob- und feinkörnig) könnten ein Hinweis auf die Abhängigkeit der RR-Anlagerung vom Funktionszustand der Zelle sein.

Es konnte nicht untersucht werden, wo die RR-positiven Einlagerungen synthetisiert werden und welche Beziehung zwischen Alter, Größe der Moleküle und Sulfatierungsgrad besteht. Das Vorhandensein granulären endoplasmatischen Retikulums in den Endo- und Epithelzellen spricht aber dafür, daß hier Proteine synthetisiert werden, welche dann über Kanäle des endoplasmatischen Retikulums zur Golgi-Region transportiert werden, wo sie an dort evtl. synthetisierte Glykosaminoglykane gekoppelt werden (MERKER 1971, FAWCETT 1973, WATSON et al 1976). GNÄDINGER et al (1975) und SCHWAGER-HÜBNER et al (1976) fanden, daß Kulturen von Epithelzellen der Cornea Glykosaminoglykane synthetisieren, die einen niedrigen Sulfatierungsgrad haben. Die Experimente ergaben, daß Glykosaminoglykane des Epithels im allgemeinen gegen die Enzyme widerstandsfähiger waren als die Glykosaminoglykane der Fibroblasten.

Zu bedenken bleibt, daß BLECKMANN (1976) mit quantitativ-chemisch-analytischen Methoden keine charakteristischen Baubestandteile von Glykosaminoglykanen am Hornhautepithel von Rindern nachweisen konnte.

Die durch Transmissionselektronenmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie und energiedispersive Röntgenmikroanalyse gewonnenen Befunde am Corneaendothel lassen erkennen:

1. Mit den hier benutzten Methoden konnte kein Unterschied in der RR/OsO_4 -Auflagerung bei den verschiedenen Spezies

(Mensch, Hund und Meerschweinchen) gefunden werden.

2. RR bildet allein und in Verbindung mit OsO_4 einen dicken, schwarzen Saum auf der äußeren Lamelle der Zellmembran. Dabei sind die Auflagerungen des RR/ OsO_4 -Komplexes aber stärker als die der RR-Färbung allein.
3. Die testikuläre Hyaluronidase Kinetin^R führt zu einer Auflockerung des RR/ OsO_4 -positiven Saumes bzw. zu einer Herabsetzung der Ruthenium-Auflagerung auf der Zelloberfläche. Daraus wird geschlossen, daß RR neben anderen sauren Gruppen (BLANQUET 1976) am Endothel der Cornea mit großer Wahrscheinlichkeit auch Glykosaminoglykane markiert.
4. Eine 24stündige Vorfixierung der Cornea in Glutaraldehyd führt zu einer Strukturveränderung des RR/ OsO_4 -positiven Saumes, wenn diese Präparate erst danach mit Hyaluronidase inkubiert werden. Diese Strukturänderung ist aber verschieden von der unter 2. genannten.
5. Im descemetischen Bereich des Interzellularspaltes und in der Descemetischen Membran selbst sind Niederschläge des RR/ OsO_4 -Komplexes nachweisbar. Dies spricht gegen ein echtes „Schlußbleistennetz“ und für einen offenen interzellulären Verbindungsweg für das RR von der Vorderkammer zur Descemetischen Membran.

Es scheint denkbar, auf immunologischer Basis eine genaue Vorstellung über die Zusammensetzung und Art der Glykosaminoglykane am Corneaendothel zu erhalten. Auf dem Gebiet der Elektronenmikroskopie könnte sich dabei demnächst die sog. Kathodoluminiszenz als wertvoll erweisen.

Weiteren Untersuchungen bleibt es vorbehalten, ob sich aus dem Wissen um das Vorhandensein einer mit RR markierbaren und Hyaluronidase-empfindlichen Substanz auf der äußeren Lamelle der Zellmembran des Corneaendothels therapeutischer und diagnostischer Nutzen ziehen läßt und ob sich für die Theorie der Durchsichtigkeit der Cornea neue Gesichtspunkte ergeben.

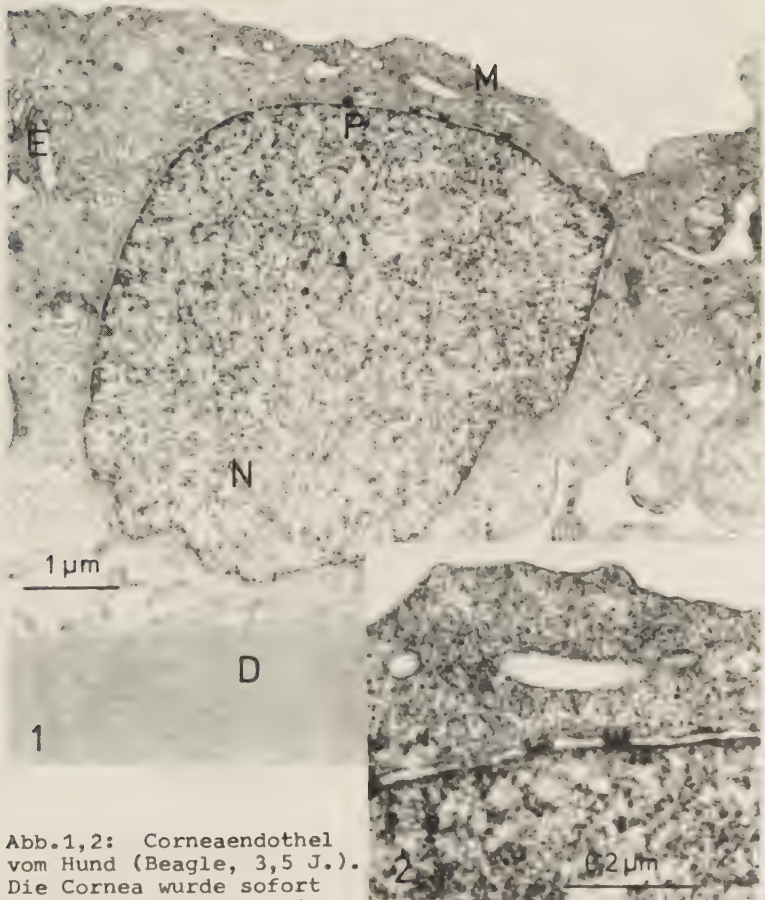


Abb.1,2: Corneaendothel vom Hund (Beagle, 3,5 J.). Die Cornea wurde sofort nach der Trepanation in 1,4% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer und später in cacodylatgepufferter 2% Osmiumsäure fixiert. Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat. Die Zellmembran (M) hebt sich nicht wesentlich vom Cytoplasma ab. E = endoplasmatisches Retikulum, N = Zellkern, P = Kernpore, D = Descemetische Membran.

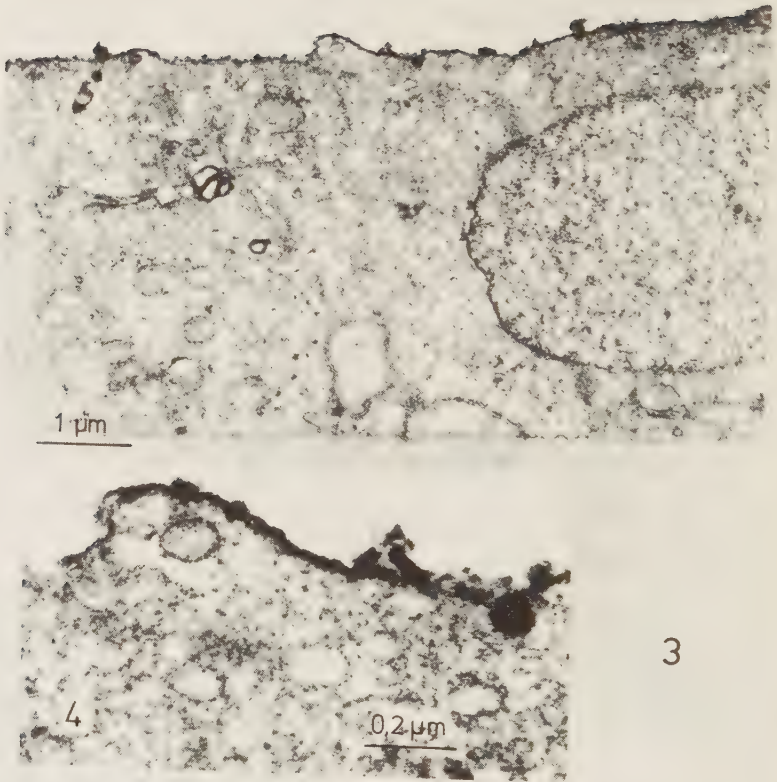


Abb.3,4: Corneaendothel vom Hund (Beagle, 3,5 J.). Färbung und Fixierung in Ruthenium-Rot (RR) (1500 ppm), dann in Ruthenium-Rot (800 ppm) mit 2% Osmiumtetroxyd (RR/OsO₄). Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat.⁴ Auf der äußeren Lamelle der Zellmembran findet sich ein homogener und grobkörniger, kontrastreicher Saum.

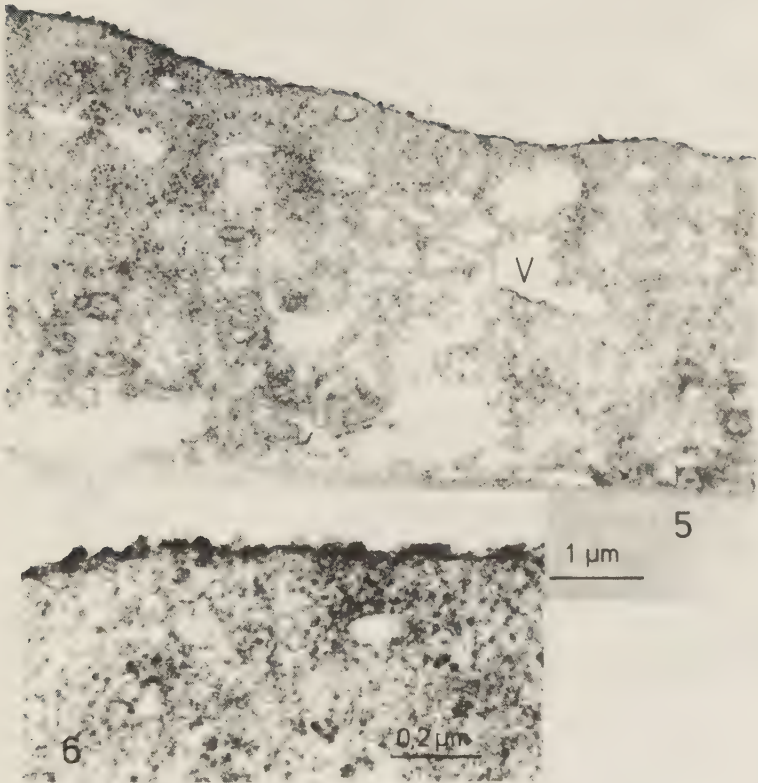


Abb.5,6: Corneaendothel vom Hund. (Beagle, 3,5 J.). Nach der Trepanation wurde die Hornhaut zunächst 30 Minuten in Hyaluronidase inkubiert (150 I.E./ml). Färbung und Fixierung mit RR/OsO_4 wie bei Abb.3,4. Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat. Im Vergleich zum vorhergehenden Präparat hier ein aufgelockerter, schmaler Saum geringer Dichte und mit vereinzelt grobkörnigen Strukturen. Innerhalb der Zelle finden sich größere postmortal entstandene cytoplasmafreie Bezirke = V.

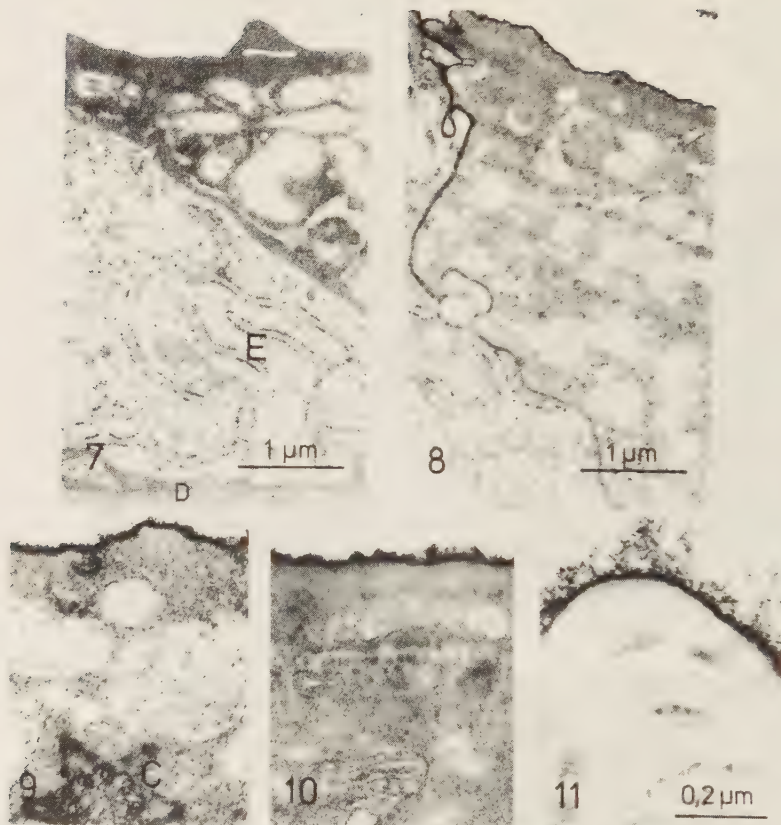


Abb. 7-11: Corneaendothel vom Meerschweinchen. Abb. 7: Kontrastierung und Nachfixierung mit OsO_4 . Kein kontrastgebender Saum auf der Zellmembran. E = rauhes endoplasmatisches Retikulum, D = Descemet'sche Membran. Abb. 8, 9: Färbung mit RR/OsO_4 : deutlicher, RR -positiver Saum auf der Zellmembran und teilweise im Interzellularspalt. Vergrößerung: homogene, dicke RR/OsO_4 -Auflagerung. C = Centriol mit pericentriolärem Körper. Abb. 10: Inkubation der Cornea in Tris-HCl-Puffer (Lösungsmittel des Enzyms) (30 Min). Danach gewöhnliche RR/OsO_4 -Kontrastierung. Der RR -positive Saum zeigt kaum Veränderungen zu Abb. 9. Die geringfügige Auflockerung in der homogenen, teilweise grobkörnigen Struktur könnte für einen Auswaschungseffekt sprechen. Abb. 11: Inkubation in Hyaluronidase (20 Min., 1500 I.E.). Deutliche flockige Auflockerung des RR -positiven Saumes, der keine grobkörnigen Auflagerungen mehr zeigt.

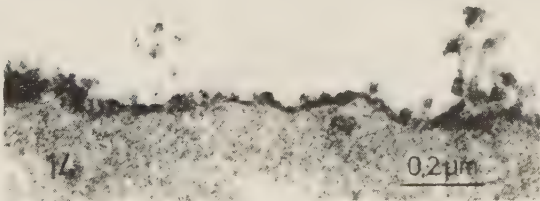
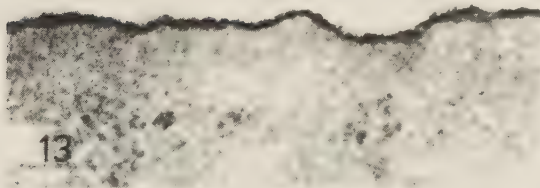


Abb.12-14: Corneaendothel vom Meerschweinchen: Alle Präparate wurden vor der weiteren Behandlung 24 Stunden in 1,4% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer fixiert. Abb.12: Behandlung mit RR/OsO_4 . Auf der Zellmembran findet sich ein dicker, homogener, kontrastreicher Saum, der sich auch in dem Mikropinozytosevesikel (V) fortsetzt. Abb.13: Behandlung der Cornea mit Tris-HCl-Puffer (Lösungsmittel des Enzyms), dann Färbung mit RR/OsO_4 . Keine wesentlichen Veränderungen des RR-Saumes im Vergleich mit Abb.12. Abb.14: Nach Inkubation in Hyaluronidase (1500 I.E., 24 Stunden) und Kontrastierung mit RR/OsO_4 findet man einen aufgelockerten, flauschigen, RR-positiven Saum mit einzelnen grobkörnigen Auflagerungen. Kontrastierung: Uranylacetat und Bleicitrat.

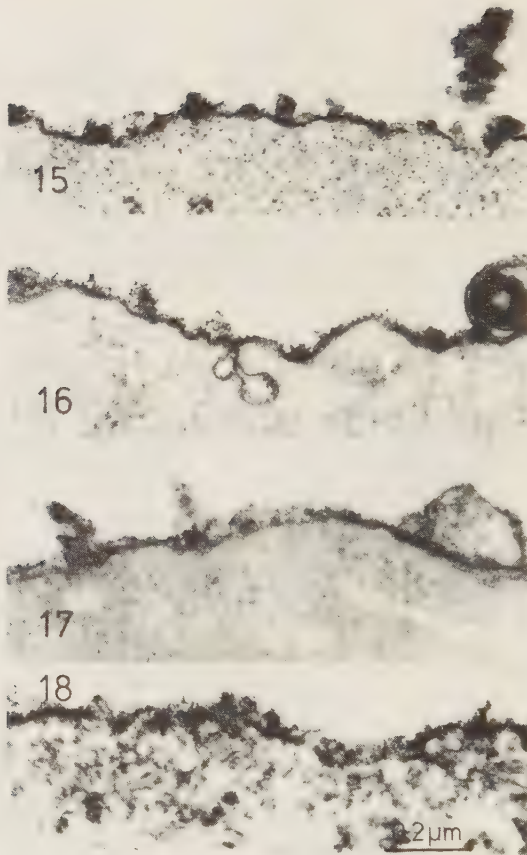


Abb.15-18: Corneaendothel vom Menschen (Amaurose bei intakter Cornea, 74 J.). Abb.15: Färbung und Fixierung mit RR/OsO_4 . Grobkörnige Auflagerungen auf der Zellmembran. Abb.16: Vor der Färbung mit RR/OsO_4 wurde das Präparat 30 Min. in Tris-HCl-Puffer inkubiert. Die grobkörnigen Auflagerungen sind nur noch teilweise vorhanden (Auswaschungseffekt oder unterschiedlicher Funktionszustand der Zelle?), die Dichte des Saumes entspricht aber der aus Abb.15. Abb.17: Inkubation in Hyaluronidase (1500 I.E., 30 Min.), Färbung mit RR/OsO_4 . Der RR-positive Saum erscheint aufgelockerter und von geringerer Dichte. Abb.18: Ebenfalls in Hyaluronidase inkubierte Zelle, deren Membranen zerstört sind. Diffuse Infiltration der RR/OsO_4 -Färbung in das Zytoplasma. Kontrastierung: Uranylacetat und Bleicitrat.

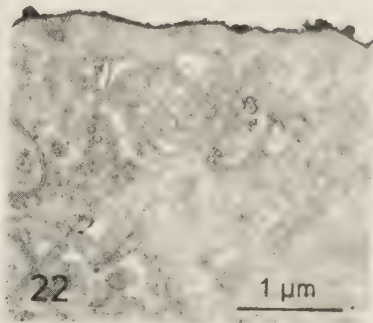
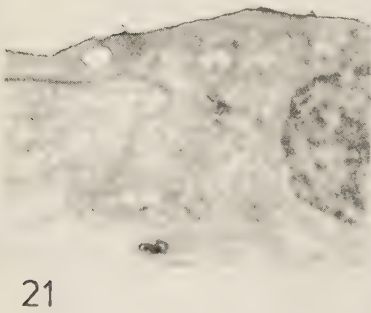
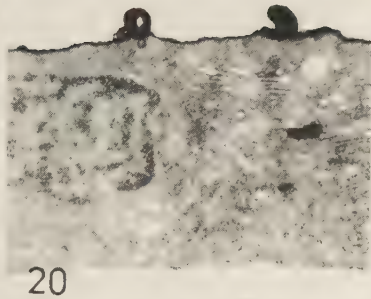
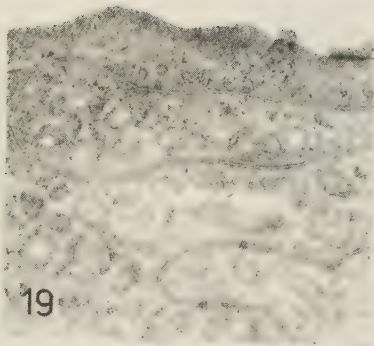
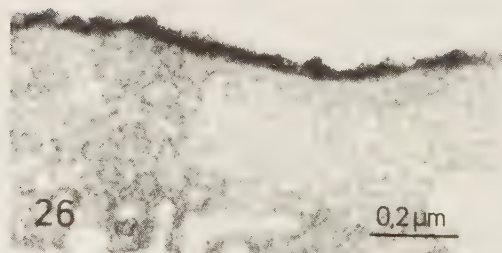
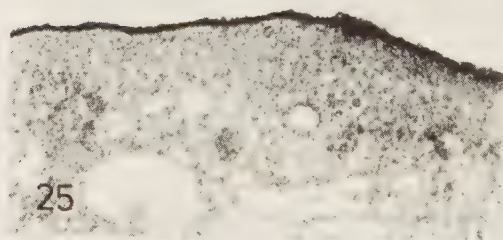
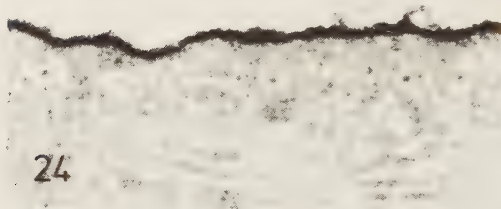
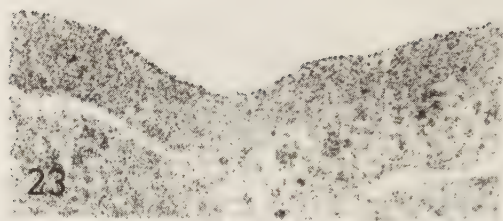


Abb.19-26: Corneaendothel vom Menschen (3 J., Retinoblastom). Alle Präparate wurden zunächst 24 Stunden in cacodylatgepufferter Glutaraldehydlösung fixiert. Abb.19,23: Nach primärer Fixierung weitere Behandlung mit cacodylatgepufferter Osmiumlösung. Keine Kontrastierung der Zellmembran. Abb.20,24: Färbung und Fixierung mit RR/OsO_4 (30 Min). Homogener, dicker, kontrastreicher Saum auf der Zellmembran. Abb.21,25: Nach der Fixierung Inkubation in Tris-HCl-Puffer (24 Stunden). Weitere Behandlung mit RR/OsO_4 . Der kontrastreiche Saum erscheint dünner (Auswaschungseffekt?), aber ebenso dicht wie in Abb.20,24. Abb.22,26: Nach der Fixierung Inkubation der Cornea in Hyaluronidase (3×1500 I.E., 24 Stunden). Weiter mit RR/OsO_4 . Der kontrastreiche Saum erscheint verbreitert, aber aufgelockerter als in Abb.20,25. Vereinzelt sind grobkörnige Strukturen erkennbar. Kontrastierung: Uranylacetat und Bleicitrat.



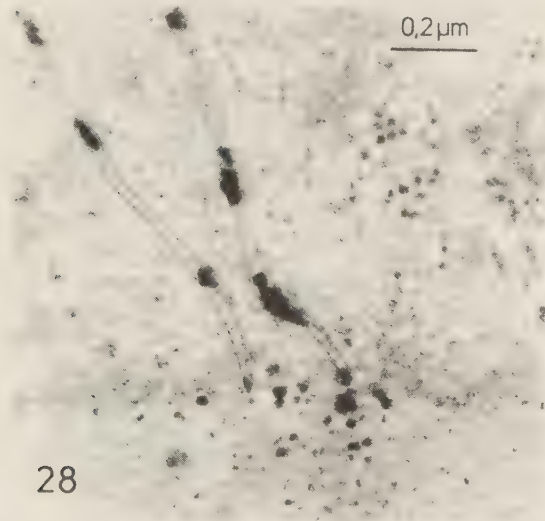
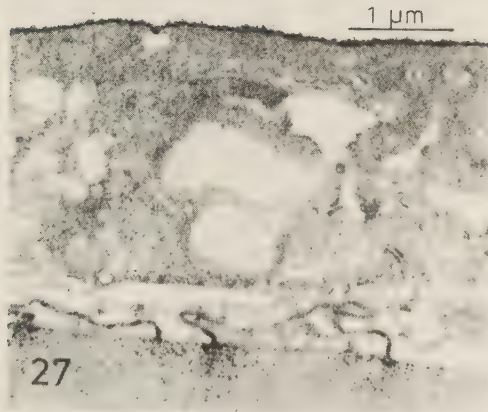
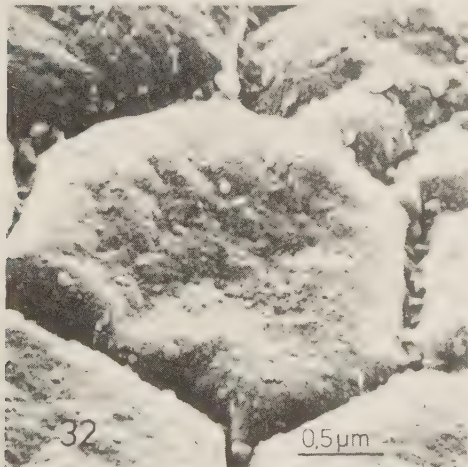
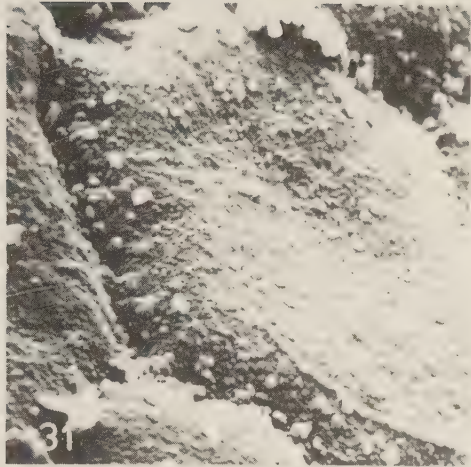


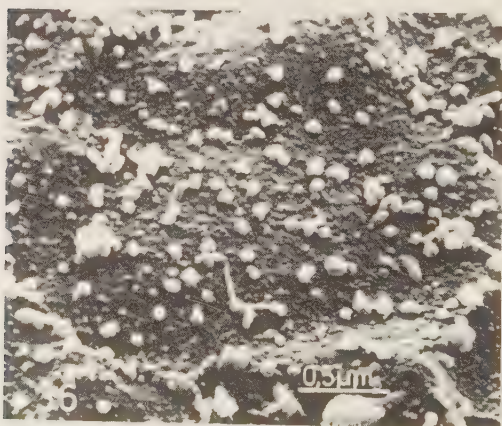
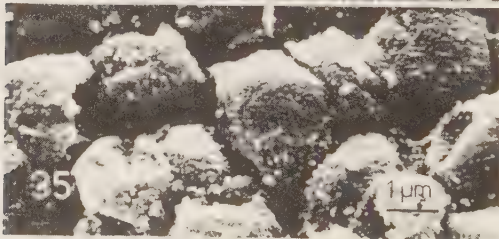
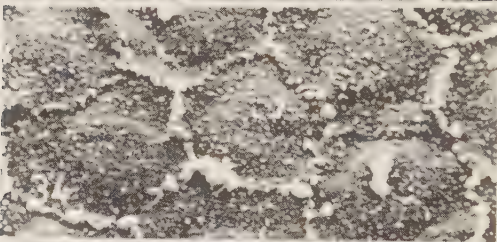
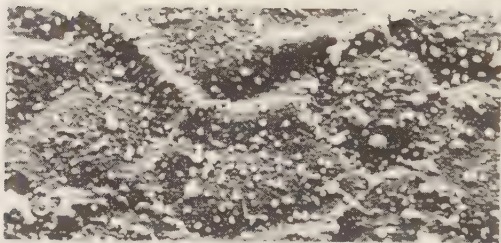
Abb. 27, 28: Corneaendothel vom Menschen. Sowohl nach Hyaluronidasebehandlung (600 I.E., Abb. 27) als auch ohne enzymatische Behandlung (Abb. 28) finden sich im Interzellularspalt und in der Descemetschen Membran kontrastgebende fein- grobkörnige Einlagerungen, die auf die Färbung mit RR/OsO_4 zurückzuführen sind. Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat.



Abb.29-32: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Corneaendothels vom Meerschweinchen. Die Präparate wurden vor der spezifischen Behandlung nicht fixiert.
Abb.29: Fixierung in cacodylatgepuffertem Glutaraldehyd.
Abb.30: Färbung mit RR ohne OsO_4 . Abb.31: 30 Minuten Tris-HCl-Puffer, dann ebenfalls RR-Färbung ohne OsO_4 .
Abb.32: Nach Inkubation mit Hyaluronidase (1500 I.E. /



30 Minuten) Färbung mit RR ohne OsO_4 .
Die Zelloberfläche der nur in Glutaraldehyd fixierten Zellen ist einigermaßen glatt (Abb.29), während nach RR-Färbung und Tris-HCl-Puffer-Behandlung mit RR auf der Oberfläche fein- grobkörnige Gebilde erscheinen (Abb.30,31), die nach vorheriger Inkubation der Zellen mit Hyaluronidase kaum noch nachweisbar sind (Abb.32).



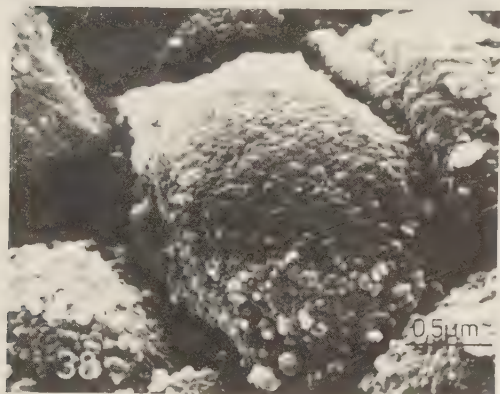


Abb.33-38: REM-Aufnahmen vom Corneaendothel des Meerschweinchens. Alle Präparate wurden zunächst in Glutaraldehyd fixiert. Dann: Abb.33,36: Färbung mit RR ohne OsO_4 . Über dem gesamten Endothel fein- bis grobkörnige Auflagerungen. Abb.34,37: 24 Stunden Inkubation in Tris-HCl-Puffer, dann Färbung mit RR. Über den Interzellularspalten grobkörnige, auf den Zellmembranen feinkörnigere Gebilde. Abb.35,38: Inkubation in Hyaluronidase (3×1500 I.E./24 Stunden), Färbung mit RR. Noch immer vereinzelt fein- bis grobkörnige Niederschläge auf der blasig aufgetriebenen Zellmembran, so daß hier nicht von einer eindeutigen Wirkung des Enzyms gesprochen werden kann.

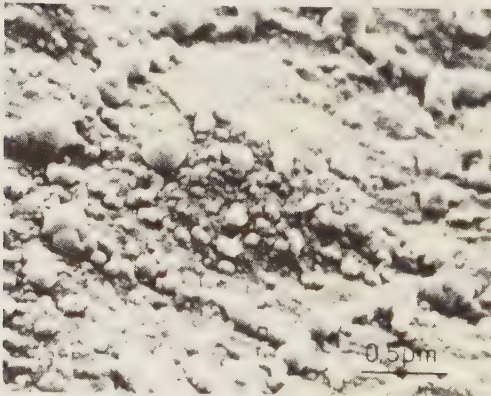
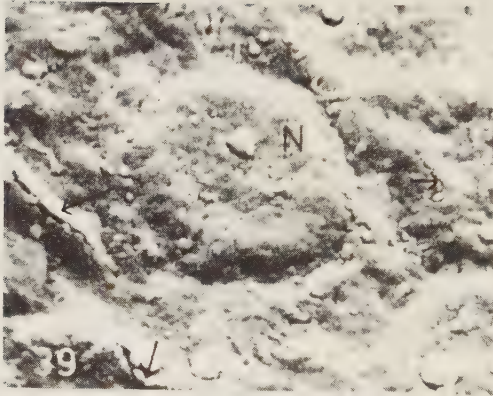
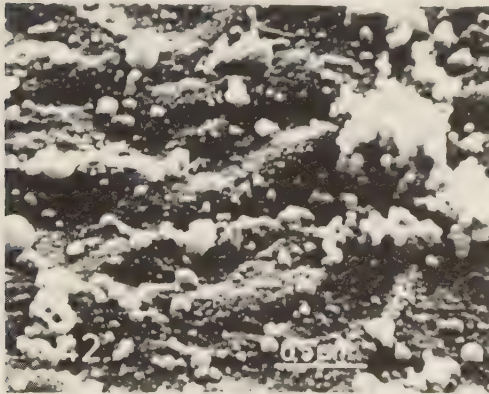
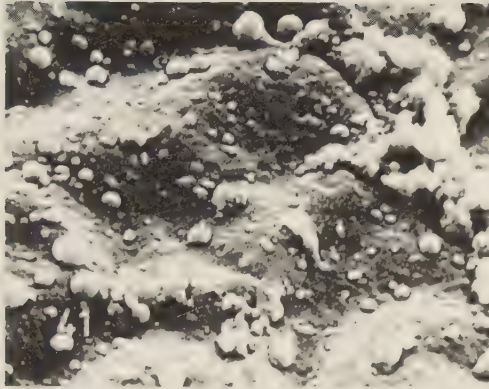


Abb.39-42: REM-Aufnahmen der Endotheloberfläche der Cornea vom Menschen (3 J., Retinoblastom). Alle Präparate wurden zunächst 24 Stunden fixiert, bevor sie ihrer spezifischen Behandlung zugeführt wurden. Abb.39: Nach Fixierung nochmals in Glutaraldehyd ohne OsO_4 (24 Stunden). Abb.40: Färbung mit RR ohne OsO_4 . Abb.41: Inkubation in Tris-HCl-Puffer, dann RR. Abb.42: Nach Inkubation in Hyaluronidase (3×1500 I.E./24 Stunden) Färbung mit RR. (Fortsetzung nächste Seite).



Die Endotheloberfläche ist ohne RR-Färbung fast glatt. Ein Zellkern (N) wölbt die Zellmembran vor. Trotz Critical-Point-Trocknung hier artifiziell entstandene Bruchlinien (→) am Zellrand (Abb.39). Nach RR-Färbung massenhaft klumpige Gebilde auf der Zelloberfläche (Abb. 40), die bei vorheriger Tris-HCl-Puffer-Behandlung mengenmäßig reduziert sind (Abb.41). Auch nach Inkubation mit Hyaluronidase (3x1500 I.E./24 Stunden) finden sich noch zahlreiche große und kleine körnige Auflagerungen (Abb.42).

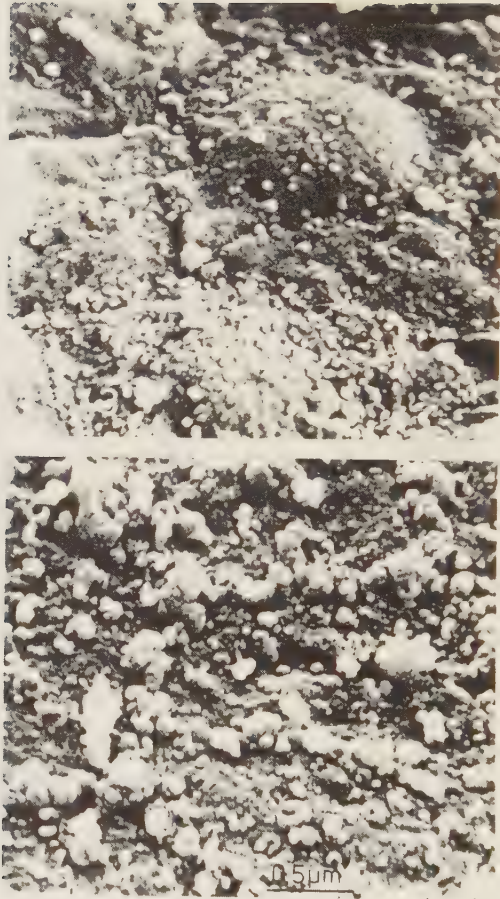
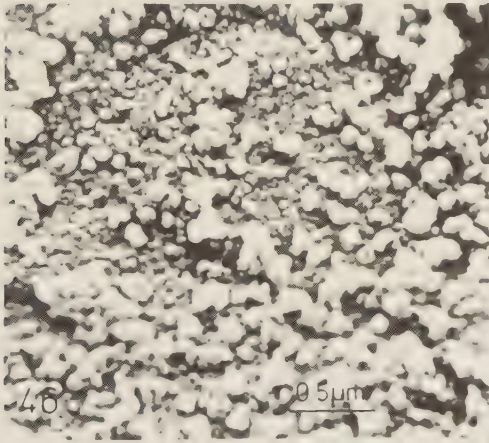


Abb.43-46: Corneaendothel vom Menschen (3 J., Retinoblastom). Alle Präparate wurden zunächst 24 Stunden fixiert. Dann: Abb.43: Nach primärer Fixierung weitere Behandlung mit Glutaraldehyd und OsO_4 . Abb.44: Färbung mit RR/OsO_4 . Abb.45: Inkubation in Tris-HCl-Puffer (24 Stunden), dann Färbung mit RR/OsO_4 . Abb.46: Inkubation in Hyaluronidase ($3 \times 1500 \text{ I.E.} / 24 \text{ Stunden}$), dann Färbung mit RR/OsO_4 . Die Osmierung allein führt schon zu einer starken



körnigen Auflagerung mit unregelmäßiger Verteilung (Abb. 43). RR in Verbindung mit OsO_4 ergibt eine Komplexverbindung mit sehr hoher Affinität zu verschiedenen sauren Gruppen der Membranoberfläche, so daß die Oberflächenstruktur der einzelnen Zellen nicht mehr zu erkennen ist (Abb. 44). Weder nach Hyaluronidase- noch nach Tris-HCl-Puffer-Inkubation werden die Zellen deutlicher sichtbar (Abb. 45, 46).

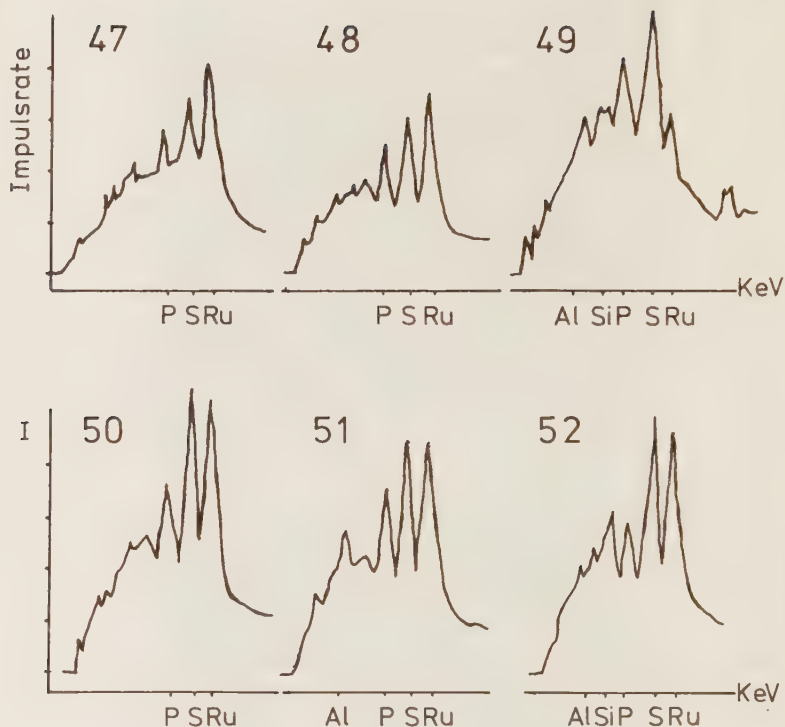


Abb.47-52: Energiedispersive Röntgenmikroanalysen der Cornea vom Meerschweinchen. Die Präparate der Abb.47-49 wurden sofort, die der Abb.50-52 erst nach einer 24 stündigen Fixierung in Glutaraldehyd ihrer spezifischen Behandlung zugeführt: Abb.47: Färbung sofort mit RR. Die Ru-Zacke ist höher als die entsprechende S-Zacke. Abb. 48: Inkubation in Tris-HCl-Puffer, dem Lösungsmittel des Enzyms, danach Färbung mit RR ohne OsO_4 . Die Ru-Zacke ist ebenfalls höher als die entsprechende S-Zacke. Abb.49: Inkubation in Hyaluronidase (1500 I.E., 30 Min.), danach Färbung mit RR. Gegenüber der S-Zacke deutlich erniedrigte Ru-Zacke. Abb.50: Nach 24stündiger Fixierung Färbung mit RR. Abb.51: Inkubation in Tris-HCl-Puffer (24 Stunden), dann RR-Färbung. Abb.52: Inkubation in Hyaluronidase (3×1500 I.E./24 Stunden), dann RR-Färbung. Bei den letzten drei Präparaten ist keine eindeutige Veränderung in der Höhe der Ru-Zacke aufgetreten. (Abkürzungen: siehe Text zu Abb.57-64).

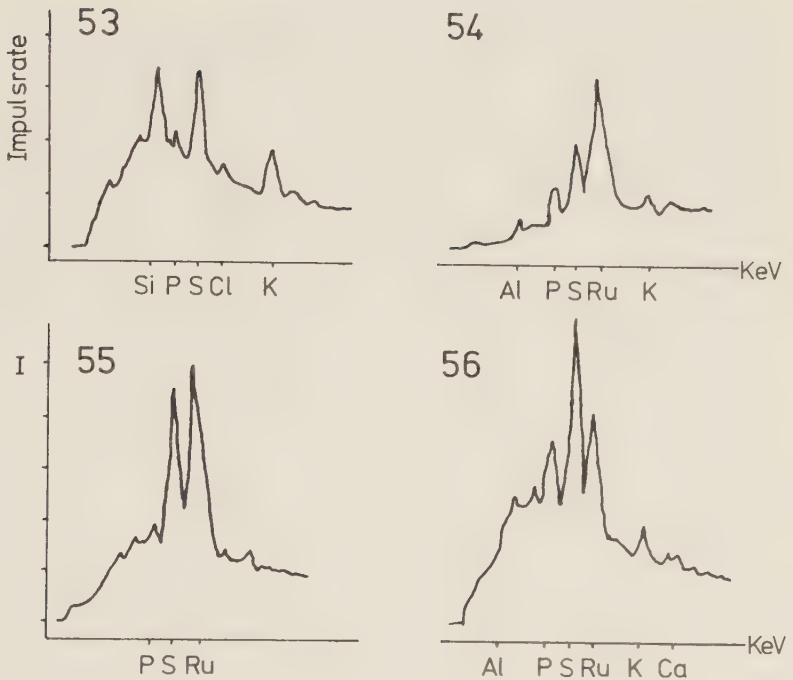


Abb.53-56: Energiedispersive Röntgenmikroanalyse der Cornea vom Menschen (74 J., Amaurose bei intakter Cornea).
Abb.53: Fixierung in cacodylatgepuffertem Glutaraldehyd. Die Chlor-Zacke ist deutlich niedriger als die S-Zacke. Keine Ru-Zacke. Abb.54: Färbung mit RR ohne OsO_4 . Die Ru-Zacke ist deutlich höher als die S-Zacke. Abb.55: Behandlung der Cornea 30 Minuten in Tris-HCl-Puffer (Lösungsmittel des Enzyms), dann Färbung mit RR. Die Ru-Zacke ist immer noch höher als die S-Zacke. Abb.56: Inkubation in Hyaluronidase für 30 Minuten (1500 I.E.): Gegenüber der S-Zacke ist die Ru-Zacke deutlich niedriger. (Die Aluminiumzacke entsteht durch den das Präparat tragenden Aluminiumteller).

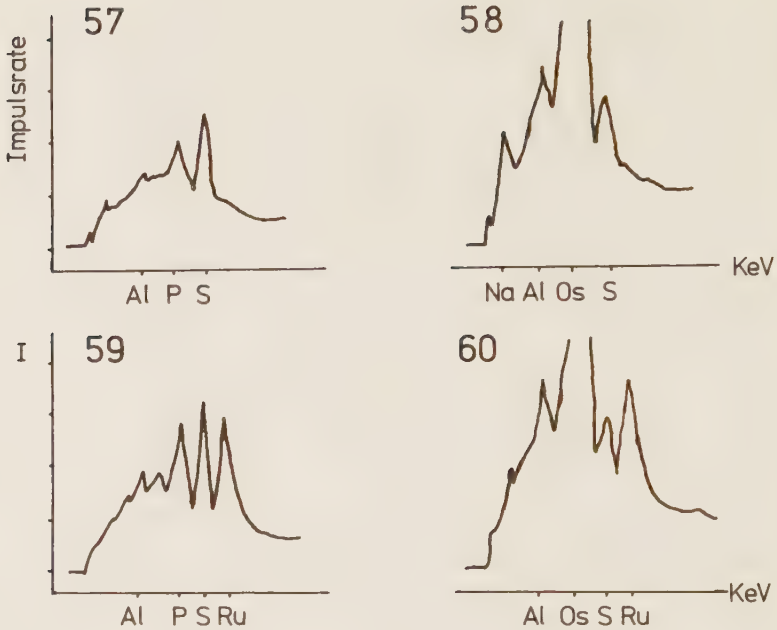
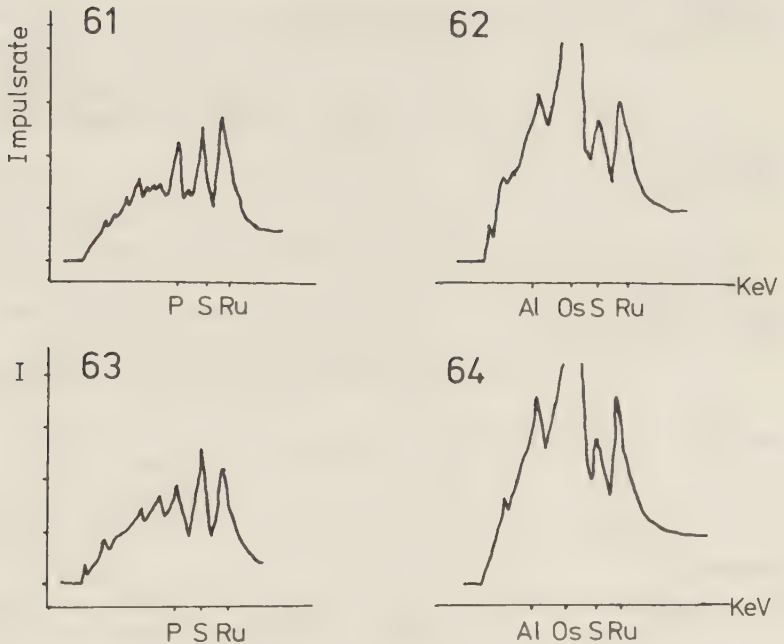


Abb.57-64: Energiedispersive Röntgenmikroanalysen der Corneaendotheloberfläche (Mensch, 3 J., Retinoblastom). Alle Präparate wurden zunächst 24 Stunden fixiert, bevor sie ihrer spezifischen Behandlung zugeführt wurden. Abb.57: Nach primärer Fixierung weitere Behandlung mit cacodylatgepuffertem Glutaraldehyd ohne OsO_4 , Abb.58: Glutaraldehyd mit OsO_4 . Abb.59: Färbung mit RR ohne OsO_4 , Abb.60: Färbung mit RR/ OsO_4 . Abb.61: Inkubation in $\text{H}_2\text{Iris-HCl}$ -Puffer (24 Stunden), dann Färbung mit RR, Abb.62: Färbung mit RR/ OsO_4 . Abb.63: Inkubation in Hyaluronidase (3×1500 I.E./24 Stunden), dann Färbung mit RR, Abb.64: Färbung mit RR/ OsO_4 . Die Höhe der Ru-Zacke der nicht osmierten Präparate (Abb.59, 61, 63) entspricht etwa der Höhe der zugehörigen S-Zacke. Nach Hyaluronidasebehandlung (Abb.63) ist die Ru-Zacke im Vergleich zur S-Zacke etwas niedriger als



bei Abb.59 und 61 (RR-gefärbte bzw. vorher mit Tris-HCl-Puffer behandelte Corneae).

Bei den osmierten Präparaten (Abb.58, 60, 62, 64) wurde die volle Impulsrate für Osmium hier nicht eingezeichnet. Im Vergleich mit den nicht osmierten Präparaten findet sich eine bei allen Präparaten wesentlich höhere Ru-als S-Zacke. (Ausnahme: Abb.58, ohne RR-Färbung). Nach Hyaluronidasebehandlung (Abb.64) ist die Ru-Zacke etwa genauso hoch wie bei der Cornea, die sofort nach Fixierung mit RR/OsO_4 behandelt wurde (Abb.60).

(Ordinate: relative Impulsrate (I), Abszisse: Energie der Röntgenquanten in KeV (siehe Text). Elemente: Na- Natrium, Al - Aluminium, Si - Silizium, Os - Osmium, P - Phosphor, S - Schwefel, Ru - Ruthenium, Cl - Chlor, K - Kalium, Ca - Calcium).

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- BABEL, J.
LEUENBERGER, P.M. „Ultrastrukturelle Veränderungen der Hornhaut nach Verabreichung gewisser Medikamente", in: Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft, Bericht über die 71. Zusammenkunft in Heidelberg 1971, München 1972, 18-23.
- BARANY, E.H.
SCOTCHBROOK, S. „Influence of testicular hyaluronidase on the resistance to flow through the angle of the anterior chamber", in: Acta Physiologica Scandinavica, Stockholm 1954a, 30, 240-249.
- BARANY, E.H.
WOODIN, A.M. „Hyaluronic acid and hyaluronidase in the aqueous humor and the angle of the anterior chamber", in: Acta Physiologica Scandinavica, Stockholm 1954 b, 32, 256-290
- BARANY, E.H. „The action of different kinds of hyaluronidase on the resistance to flow through the angle of the anterior chamber", in: Acta Ophthalmologica, Copenhagen 1956, 34, 397-403.
- BENNETT, S.H. „Morphological aspects of extracellular polysaccharides", in: The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Baltimore 1963, 11, 14-23.
- BENNINGHOFF, A.
GOERTTLER, K. Lehrbuch der Anatomie des Menschen, München 1968, 10.Aufl., 1, 32-35.
- BERGGREN, L.
VRABEC, F. „Demonstration of a coating substance in the trabecular meshwork of the eye, and its decrease after perfusion experiments with different kinds of hyaluronidase", in: American Journal of Ophthalmology, Chicago 1957, 44, 200-208.
- BLANQUET, P.R. „Ultrahistochemical study on the Ruthenium-Red surface staining", in: Histochemistry, Berlin 1976, 47, 175-189.
- BLECKMANN, H.
WOLLENSAK, J. „Topochemische Untersuchungen des Glykosaminoglykanstoffwechsels der Rinderhornhaut", in: Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie, Berlin 1973/74, 189, 71-80.

- BLECKMANN, H. „The content of glycosaminoglycans in bovine corneal epithelium and precorneal fluid-film", in: Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie, Berlin 1976, 200, 235-242.
- BLÜMCKE, S.
MORGENROTH, K. „The stereo ultrastructure of the external and internal surface of the cornea", in: Journal of Ultrastructure Research, New York 1967, 18, 502-518.
- BLÜMCKE, S. persönliche Mitteilung, 1977.
- BUDDECKE, E.
WOLLENSAK, J. „Saure Mukopolysaccharide und Glykoproteine der menschlichen Cornea in Abhängigkeit vom Lebensalter und bei Keratokonus", in: Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie, Berlin 1966, 171, 105-120.
- COOK, G.M.W. „Glycoproteins in membranes", in: Biological Reviews, Cambridge 1968, 43, 363-391.
- DONN, A.
MAURICE, D.M.
MILLS, N.L. „Studies on the living cornea in vitro" A.M.A. Archives of Ophthalmology, 1959, 62, 741-757.
- FAWCETT, D.W. Atlas zur Elektronenmikroskopie der Zelle, München 1973, Urban-Schwarzenberg.
- FISCHBARG, J.
LIM, J.J. „Role of cations, anions and carbonic anhydrase in fluid transport across rabbit corneal endothelium," in: The Journal of Physiology, Cambridge 1974, 241, 647-675.
- FLORKIN, M.
STOTZ, E.H. Comprehensive Biochemistry, Enzyme Nomenclature, Amsterdam 1973, 294-95.
- GEBBERS, J.-O.
OTTO, H.F. „Electron microscopic studies on the intestine using Ruthenium-Red", in: Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Cell and Tissue Research), Berlin 1974, 147, 274-283.

- GNÄDINGER, M.C.
SCHWAGER-HÜBNER, M.E. „Biosynthesis of glycosaminoglycans by mammalian corneal epithelium and fibroblasts in vitro", in: Albrecht v. Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie, Berlin 1975, 196, 21-30.
- GRIERSON, I.
LEE, W.R. „Acid mucopolysaccharides in the out-flow apparatus", in: Experimental Eye Research, London 1975, 21, 417-31
- GUSTAFSON, G.T.
PIHL, E. „Staining of mast cell acid glycosaminoglycans in ultrathin sections by ruthenium red", in: Nature, London 1967, 216, 697-698.
- HANTSCH, H. „Die energiedispersive Röntgenmikroanalyse am Rasterelektronenmikroskop", in: Rasterelektronenmikroskopie, Beiträge aus dem Berliner Arbeitskreis für Biologisch-Medizinische Rasterelektronenmikroskopie, Pressedienst der Freien Universität Berlin, 1974, 2, 20-34.
- HARNISCH, J.-P. „Elektronenmikroskopische Darstellung saurer Mukopolysaccharide im Trabekelwerk", in: Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde, Stuttgart 1976, 169, 90-94.
- HODSON, S.
MILLER, F. „The bicarbonate ion pump in the endothelium which regulates the hydration of rabbit cornea", in: The Journal of Physiology, Cambridge 1976, 263, 563-577.
- HÜNDGEN, M.
WEISSENFELS, N.
SCHÄFER, D. „Der Einfluß der Osmolalität auf die Fixierungsqualitäten von acht verschiedenen Aldehyden", in: Cytobiologie, Stuttgart 1971, 4, Heft 1, 62-72
- KAYE, G.J.
PAPPAS, G.D. „Studies on the cornea, I. The fine structure of the rabbit cornea and the uptake and transport of colloidal particles by the cornea in vivo", in: The Journal of Cell Biology, New York 1962, 12, 457-479.
- KAYE, G.J.
PAPPAS, G.D.
DONN, A.
MALLET, N. „Studies on the cornea, II. The uptake and transport of colloidal particles by the living rabbit cornea in vitro", in: The Journal of Cell Biology, New York 1962, 12, 481-501.

- KLYCE, S.D. „Transport of Na, Cl, and water by the rabbit corneal epithelium at resting potential", in: American Journal of Physiology, Baltimore 1975, 228, 1446-1452.
- LUFT, J.H. „Electron microscopy of cell extraneous coats as revealed by the ruthenium red staining", in: The Journal of Cell Biology, New York 1964, 23, 54-55.
- LUFT, J.H. „Ruthenium red and violet, I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action", in: The Anatomical Record, Philadelphia 1971 a, 171, 347 ff.
- LUFT, J.H. „Ruthenium red and violet, II. Fine structural localisation in animal tissues", in: The Anatomical Record, Philadelphia 1971 b, 171, 369 ff.
- MAURICE, D.M. „The physics of corneal transparency", in: The transparency of the cornea, edited by Sir Stuart Duke-Elder and E.S. Perkins, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1960, II, 41-49.
- MAURICE, D.M. „The chemical and physical basis of corneal transparency", in: Biochemistry of the Eye, edited by M.U.Dardenne and J.Nordmann, Karger, Basel 1968.
- MAURICE, D.M. „Nutritional aspects of corneal grafts and prostheses", in: International Cornea-Plastic Surgery, edited by P.V. Rycroft, Pergamon Press, New York 1969.
- MELTON, C.E.
HAYES, D.W. „Modification of facility of outflow" in: American Journal of Ophthalmology, Chicago 1959, 47, 657-663.
- MELTON, C.E.
DE VILLE, W. „Perfusion studies on eyes of four species", in: American Journal of Ophthalmology, Chicago 1960, 50, 302-308.

- MERKER, H.J.
STRUWE, K. „Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Problem der Sekretion der bindegewebigen Interzellularsubstanz", in: Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie, Berlin 1971, 115, 212-225.
- MERKER, H.J.
GÜNTHER, T. „Die elektronenmikroskopische Darstellung von Glykosaminoglykanen im Gewebe mit Ruthenium-Rot", in: Histochemie, Berlin 1973, 34, 293-303.
- MISHIMA, S.
HEDBYS, B. „The permeability of the corneal epithelium and endothelium to water", in: Experimental Eye Research, London 1967, 6, 10-32.
- MULTIER, A.M. „Präparationsmethoden für die Raster-elektronenmikroskopie", in: Raster-elektronenmikroskopie, Beiträge aus dem Berliner Arbeitskreis für Biologisch-Medizinische Rasterelektronenmikroskopie, Pressedienst der Freien Universität Berlin, 1974, 2, 39-44.
- MYERS, D.B.
HIGHTON, T.C.
RAYNS, D.G. „Acid mucopolysaccharides closely associated with collagen fibrils in normal human synovium", in: Journal of Ultrastructure Research, New York 1969, 203-213.
- OTTERSEN, O.P.
VEGGE, T. „Ultrastructure and distribution of intercellular junctions in corneal endothelium", in: Acta Ophthalmologica, Copenhagen 1977, 55, 69-78.
- PLATT, D. „Biochemische Eigenschaften verschiedener Hyaluronidase Präparate", in: Arzneimittelforschung (drug research) 1970, 12, S. 1836-1838
- PLATT, D. persönliche Mitteilung, 1977
- RAMBOURG, A.
NEUTRA, M.
LEBLOND, C.P. „Presence of a cell coat rich in carbohydrate at the surface of cells in the rat", in: The Anatomical Record, Philadelphia 1967, 154, 41-72.
- REIM, M. „Warum ist die Hornhaut durchsichtig?" in: Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft, Bericht über die 71. Zusammenkunft in Heidelberg 1971, München 1972, 71, 58-77.

- REIMER, L. Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden, Berlin 1967, 12.Aufl., 520.
- REYNOLDS, E.S. „The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy“, in: The Journal of Cell Biology, New York 1963, 17, 208-212.
- SCHWAGER-HÜBNER, M.E.
GNÄDINGER, M.C. „Synthesis of sulfated glycosaminoglycans by the three cell types of the rabbit cornea in culture“, in: Experientia, Basel 1976, 32, 15-16.
- SCHWARZ, W. „Der praecorneale Glykosaminoglykanfilm beim Haushuhn“, in: Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie, Berlin 1973, 138, 295-298.
- SHABO, A.L.
REESE, T.S.
GAASTERLAND, D. „Postmortem formation of giant endothelial vacuoles in Schlemm's canal of the monkey“, in: American Journal of Ophthalmology, Chicago 1973, 76, 896-905.
- STAEHELIN, A. „Structure and functions of intercellular junctions“, in: International Review of Cytology, New York 1974, 39, 191-283.
- Symposium Symposium on the Cornea, Transactions of the New Orleans Academy of Ophthalmology, Saint Louis 1972, 11-13.
- SZUBINSKA, B.
LUFT, J.H. „Ruthenium red and violet, III. Fine structure of the plasma membrane and extraneous coats in amoebae“, in: The Anatomical Record, Philadelphia 1971, 171, 417-441.
- VRABEC, F. „The inner surface of the trabecular meshwork, studied by a replica technique“, in: American Journal of Ophthalmology, Chicago 1957, 44, 7-12.
- WATSON, P.G.
HAZLEMAN, B.L. The sclera and systemic disorders, London 1976, W.B.Saunders Company Ltd., 30-37.

WULLE, K.G.
RUPRECHT, K.W.
WINDRATH, L.C.

„Electron microscopy of the development of the cell junctions in the embryonic and fetal human corneal endothelium", in: Investigative Ophthalmology, St.Louis 1974, 13, 923-934.

LEBENS LAUF

Am 25. Januar 1951 wurde ich als drittes Kind des Chemikers Dr. Walter Hornung und seiner Ehefrau Ruth, geb. Backen, in Köln-Lindenthal geboren.

Von April 1957 bis 1961 besuchte ich die Volksschule Köln-Stammheim, von April 1961 bis März 1962 die Volksschule in Köln-Flittard. Dann ging ich im April 1962 auf das Städtisch-mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Köln-Mülheim, das ich im Dezember 1965 verließ, da wir nach Kiel umzogen.

Meine weitere Schulbildung erhielt ich an der Humboldt-Schule in Kiel, wo ich am 9. Juni 1970 meine Reifeprüfung ablegte.

Zwischendurch - von August 1968 bis Juli 1969 - besuchte ich in den Vereinigten Staaten im Rahmen eines Schüleraustauschprogramms die High-School in Eaton Rapids, Michigan, und erwarb dort im Mai 1969 das High-School Diplom (Graduation).

Im Wintersemester 1970/71 nahm ich an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel das Studium der Physik, Chemie und Mathematik auf. Nach diesem Semester begann ich an der Freien Universität Berlin das Studium der Humanmedizin, das ich am 22. Februar 1977 mit dem Staatsexamen abschloß.

Meine Doktorarbeit begann ich während des Studiums im August 1974 und schloß sie während meiner Medizinalassistentenzeit (Mai-Juli 1977) in der Augenabteilung des Klinikums Westend ab.

Berlin, im Juli 1977

Michael Hornung

1900

